

## 明 細 書

酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、  
酵素の保存法及び酵素の再生法

### 技術分野

[0001] 本発明は、酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、  
酵素の保存法及び酵素の再生法に関する。

### 背景技術

[0002] 酵素は触媒活性を有するタンパク質であり、種々の生体反応を司ることにより、生命  
の維持に貢献している。

[0003] 酵素は、水分を含有した状態では室温で不安定である。それ故、凍結状態で保存  
されるか、あるいは $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で安定化剤とともに液体中で保存される。

[0004] ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、DNAポリメラーゼという酵素により触媒される核酸  
増幅反応であるが、DNAポリメラーゼは通常バッファー中で $-20^{\circ}\text{C}$ の温度で保存さ  
れる。このような保存のためには、冷凍庫が必要である。また、この酵素が供給者から  
使用者に配送されるにあたっては、ドライアイスとともに発泡スチロールなどの容器に  
箱詰めされる。これらの保存・配送方法は、特別の設備や作業を要するため、操作が  
煩雑で費用のかかるものである。

### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、酵素を保存するための簡便な方法を提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、DNAポリメラーゼをトレハロースと混合した状態で支持体に固定し  
て保存した後、PCRを行ったところ、PCR反応が進行することを見出し、本発明を完  
成させるに至った。

[0007] 本発明の要旨は以下の通りである。

[0008] (1) 酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。

[0009] (2) 上記保護剤がトレハロース及びその誘導体からなる化合物群より選択される少

なくとも一種類の化合物である(1)記載の支持体。

[0010] (3) 酵素反応の促進剤をさらに含む(1)又は(2)に記載の支持体。

[0011] (4) 上記酵素に対するアプタマーをさらに含む(1)ないし(3)の何れか一項に記載の支持体。

[0012] (5) 酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体。

[0013] (6) 上記酵素がDNAポリメラーゼである(1)ないし(5)の何れか一項に記載の支持体。

[0014] (7) さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含んでなる(6)記載の支持体。

[0015] (8) さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応の鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含んでなる(6)に記載の支持体。

[0016] (9) (1)ないし(8)の何れか一項に記載の支持体を含む印刷物。

[0017] (10) (1)ないし(8)の何れか一項に記載の支持体を含む試薬キット。

[0018] (11) (1)記載の支持体を製造する方法であって、酵素及び保護剤の混合溶液を調製し、該溶液を支持体に適用し、該支持体を乾燥することにより、前記酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定することを含む前記の方法。

[0019] (12) (1)ないし(8)の何れか一項に記載の支持体を液体に浸漬させることにより、該液体中に酵素を溶出させることを含む、支持体に固定された酵素を再生する方法。

[0020] (13) (6)ないし(8)の何れか一項に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法。

[0021] また、本発明は、酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態で保存する方法を提供する。

[0022] さらに、本発明は、上記(7)に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼと、鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つとを溶出させる工程と、当

該DNAポリメラーゼと鋳型となる核酸および/またはプライマーとを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法を提供する。

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0024] 本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を提供する。

[0025] 酵素は、何らかの触媒活性を有するものであればいかなるものであってもよく、例えば、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNase、制限酵素、メチラーゼ、修飾酵素、ライゲース、プロテアーゼ、キナーゼ、フォスファターゼ、トランスフェラーゼ、グリコシラーゼ、トポイソメラーゼ、クロナーゼなどを例示することができるが、これらに限定されることはない。

[0026] 保護剤は、酵素を乾燥から保護し、安定に保存できるものであればいかなるものであってもよく、トレハロース及びその誘導体、多糖類、PEG、デキストラン、Ficol、グリセロール、界面活性剤、PVA及びその誘導体などを例示することができる。このうち、トレハロース及びその誘導体が効果的である。

[0027] 保護剤は市販されているものであっても、公知の方法に従って合成したものであってもよい。

[0028] トレハロースは、2分子のD-グルコースが1,1結合した非還元性二糖であり、結合様式としては、 $\alpha, \alpha-$ 、 $\alpha, \beta-$ 、 $\beta, \beta-$ の3種の異性体がある。

[0029] トレハロースの誘導体としては、トレハロースの酸エステル(例えば、ラウリン酸エステル、オレイン酸エステル、リノール酸エステル、リノレン酸エステル、ステアリン酸エステル、パルミチン酸エステル、ミリスチン酸エステルなどの脂肪酸エステル、酢酸エステル、安息香酸エステルなどのカルボン酸エステル、硫酸エステルなど)、アルキルエーテル(例えば、炭素数8〜25のアルキルとのエーテルなど)、ハライド、含窒素誘導体、含硫黄誘導体などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

[0030] トレハロース及びその誘導体は市販されているが、公知の方法で製造してもよい。トレハロース及びその誘導体の製法は、シー・ケー・リー『デベロップメンツ・イン・フード・カルボハイドレート』、1980年、アプライッド・サイエンス・パブリッシャーズ社発行、第1乃至89頁やケー・ヨシモトら『ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレイティン』、第30巻、第4号、第1, 169乃至1, 174頁(1982年)、特開平8-157491号などに

記載されている。

- [0031] 酵素1Uに対して、 $10^{-5}$ – $10^{-1}$ M、好ましくは、 $10^{-4}$ – $10^{-1}$ Mの保護剤を添加して混合するとよい。
- [0032] 支持体には、さらに、酵素反応の促進剤が固定されていてもよい。酵素反応の促進剤は、酵素反応を促進する効果がある物質であればよく、酵素反応を促進する効果には、酵素反応阻害を抑制する効果も含まれる。酵素反応の促進剤としては、例えば、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、マロン酸ナトリウム、マレイン酸ナトリウム、ジメチルスルホキシド、ベタイン、グリセロール、アルブミン、界面活性剤(例えば、tween20, Triton X100, NP40など)、ポリアミン(例えばエチレンジアミン、トリメチレンジアミン、スぺルミン、スぺルミジン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミン、ペンタエチレンヘキサミン、1, 4-ビス(3-アミノプロピル)-ピペラジン、1-(2-アミノエチル)ピペラジン、1-(2-アミノエチル)ピペリジン、1, 4, 10, 13-テトラオキサー-7, 16-ディアザサイクロオクタデカンおよびトリス(2-アミノエチル)アミンなど)、糖類(例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マルトース、スクロース、ラクトース、その他多糖など)、硫酸化多糖およびその塩類(例えば、ヘパリン、デキストランサルフェイトなど)、ジチオスレイトール、ポリアニオン(例えばDNA, RNAなど)、多価アルコール(例えば、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブタンジオール、ヘキサジオール、オクタンジオール、グリセリン、ソルビタン、トリメチロールプロパン、ネオペンチルグリコールなどの脂肪族多価アルコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等)、硫酸アンモニウム、第四級アンモニウム塩(例えば、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルピリジニウムクロライド、ヘキサジメチリンブロミド、ヘキサフルオレニウムブロミド、メチルアゾリニウムブロミドなど)などを例示することができるが、これらに限定されることはない。酵素反応促進剤としては、Ampdirect<sup>(R)</sup>(島津製作所社製)などが挙げられ、DNAポリメラーゼの反応促進に有効である。
- [0033] 酵素反応促進剤は、反応液中に、例えばポリアミンであれば、 $10^{-4}$ – $0.01$ mM程度、好ましくは $2 \times 10^{-4}$ – $0.5$ mMで存在するように、適当な量の酵素反応促進剤を支持体に固定するとよい。酵素反応促進剤は、酵素及び保護剤の混合物と同じ位置で支持体

上に固定されてもよいし、酵素及び保護剤とは異なる位置で支持体に固定されてもよい。

[0034] 支持体は、酵素及び保護剤の混合物を固定できるものであればいかなるものであってもよく、例えば、紙(例えば、60MDP紙(三島製紙製)、コピー用紙、上質紙、中質紙、ケント紙、画用紙、クラフト紙、インクジェット専用紙、トレーシングペーパー、和紙、ボール紙、濾紙など)、ガラス基板、シリコン基板、ビース、カラム充填剤、シリカゲル、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、PVA膜などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

[0035] 支持体の厚さは、例えば、1mm以下とすることができる。この厚さを非常に薄くすれば(例えば0.1mm程度)、酵素及び保護剤を固定した支持体を多数枚積層して配布する場合にも、嵩張らないので、その作業性は向上する。

[0036] 支持体には、酵素及び保護剤の他、ポリヌクレオチド(例えば、DNA、RNA、それらの誘導体、修飾体など)、オリゴヌクレオチド(例えば、DNA、RNA、それらの誘導体、修飾体など)、タンパク質(例えば、抗体、ホルモンなど)、ポリペプチド、オリゴペプチド、多糖、オリゴ糖、PNA、低分子化合物(例えば、EDTA、PCR用バッファー組成に含まれる塩、 $Mg^{2+}$ 、dNTP混合物など)、それらの混合物などが固定されていてもよい。酵素及び保護剤以外の成分は、酵素及び保護剤の混合物と同じ位置で支持体上に固定されてもよいし、酵素及び保護剤とは異なる位置で支持体に固定されてもよい。特に、酵素に対するアプタマーが支持体に固定されているとよく、本発明は、酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体も提供するものである。

[0037] 本発明の好ましい態様の一つにおいて、支持体は、DNAポリメラーゼと当該DNAポリメラーゼの保護剤の他、当該DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含む。このような支持体は、genotypingや種の同定などに使用することができる。支持体は、さらに、酵素反応の促進剤を含んでもよい。

[0038] 本発明の別の好ましい態様の一つにおいて、支持体は、DNAポリメラーゼと当該DNAポリメラーゼの保護剤の他、当該DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応(PCRなど)の鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応

のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含む。支持体は、さらに、酵素反応の促進剤を含んでもよい。

[0039] 例えば、DNAポリメラーゼを紙(支持体)に固定して保存する場合には、紙には、DNAポリメラーゼ及び保護剤の他、プライマーセット(オリゴヌクレオチド)、PCR反応の鋳型となるDNA(合成の1本鎖又は2本鎖DNAでもよいし、cDNAをクローニングしたベクターでもよい)、DNAポリメラーゼに対するアプタマー(機能性RNA)、PCR反応溶液中の各成分(すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、dNTP混合物など)、EDTAなどを固定してもよい。この場合、(1)DNAポリメラーゼ、保護剤及びプライマーセットを1スポットとして、PCR反応の鋳型となるDNA、Tris-HCl及びEDTAを別のスポットとして紙に固定してもよいし、(2)DNAポリメラーゼ、保護剤及びプライマーセット、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマーを1スポットとして紙に固定してもよいし、(3)PCR反応に必要なすべての成分(すなわち、PCR反応の鋳型となるDNA、DNAポリメラーゼ、プライマーセット、Tris-HCl、KCl、MgCl、dNTP混合物など、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー)を保護剤とともに1スポットとして紙に固定してもよい。紙にDNAポリメラーゼなどの成分がスポットティングされていることがわかるように、スポットティングする成分に色素を添加しておくともよい。色素としては、クレゾールレッド、プロモフェノールブルー、キシレンシアノールなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0040] 支持体に固定する酵素の量は、目的とする酵素反応が行われるように適宜調整するとよい。例えば、PCR反応が行われるようにするためには、1スポット当たり5 ng以上のDNAポリメラーゼが固定されるとよい。

[0041] 酵素及び当該酵素の保護剤の混合物が固定されている支持体は以下のようにして製造することができる。まず、酵素及び保護剤の混合溶液を調製する。酵素と保護剤の混合比は上記の通りである。溶媒は水であるとよい。さらに、この混合溶液に、酵素及び保護剤以外の上記の成分を添加してもよい。次いで、酵素及び保護剤の混合溶液を支持体に適用する。例えば、支持体が紙である場合には、スポイト、96 pin-tool(Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)、ディスプレイポータブルタイプのpin-toolなどを用いて、混合溶液を紙にスポットティングすることが

できる。その後、支持体を乾燥することにより、酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定する。酵素及び保護剤の混合物を固定した支持体は実質的に水を含まないものであるとよい。

[0042] 上記のように、酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態にすることによって、酵素を安定に保存することができる。保存条件としては、室温で、高湿度を避け、遮光下に保存することが好ましい。例えば、酵素がDNAポリメラーゼである場合、DNAポリメラーゼをトレハロースとの混合物として60MDP紙に固定した状態で室温で保存したとき、少なくとも6か月半の保存寿命が確認されている（現在、まだ保存試験は続行中である）。

[0043] 上記のように、保護剤との混合物として支持体に固定した酵素を再生するには、酵素と保護剤との混合物を固定した支持体を液体に浸漬させ、該液体中に酵素を溶出させればよい。支持体を浸漬させる液体は、酵素の再生を可能とするものであればいかなるものであってもよいが、例えば、水、水以外の成分を含有する水溶液などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。例えば、支持体に固定した酵素がDNAポリメラーゼである場合、支持体を浸漬させる液体は、水、PCR反応溶液（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、dNTP混合物などを含有する水溶液）などであるとよい。浸漬は、室温にて大気圧下で、1〜3分間行えばよい。

[0044] 支持体にDNAポリメラーゼが固定されている場合には、この支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させ、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことにより、核酸を増幅することができる。

[0045] また、本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を含む印刷物を提供する。

[0046] 印刷物としては、教科書などの成書、ハンドブック、カタログ、定期刊行物、雑誌、論文、冊子、小冊子、リーフレット、パンフレット、報告書、ポスター、カード、ラベルなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

[0047] 図1は、本発明の印刷物における、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポットニングされている紙（支持体）の一例を示す。紙6には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、PCR反応の鋳型となるcDNAクローン及びそ

その他のPCR反応に必要な成分(すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー)とともにスポッティングされている(以下、このスポットを「DNA Spot」1という)。紙6には、DNA Spot1の他に、cDNAクローンがコードするタンパク質の名前2 (malate dehydrogenaseなど)、cDNAクローンの識別番号3 (Clone ID)、cDNAクローンの塩基配列4 (DNA sequence)、実験(PCR反応)の手順の説明文5 (Procedures)が印刷されている。

[0048] 図2は、図1に示すDNA Spot1を有する紙6を別紙として添付している学术论文12が掲載されている雑誌13を示す。

[0049] 図3は、図1に示すDNA Spot1を有する紙6を綴じ込んだ書籍22を示す。この書籍には、さらに、目次が含まれているとよい。

[0050] 図4は、酵素(DNAポリメラーゼ)及びトレハロースの混合物がスポッティングされている紙(支持体)を綴じ込んだ書籍の別の態様を示す。酵素(DNAポリメラーゼ)及びトレハロースの混合物がスポッティングされている頁34の各格子には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、PCR反応の鋳型となるcDNAクローン及びその他のPCR反応に必要な成分(すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー)とともに、スポッティングされている(以下、このスポットを「DNA Spot」31という。)。これらのスポット31を有する頁34には、スポットを識別するための記号(列番号)32及び(行番号)33が印刷されている。さらに、DNAをスポッティングした頁の識別番号30 (Rearray PLATE ID)が印刷されている。スポッティングされているcDNAクローンに関する情報(例えば、cDNAクローンがコードする酵素のEC number、cDNAクローンがコードする酵素の名前 (Gene name)、クローンのID番号(RIKEN Clone ID)、寄託番号(Accession Number)、cDNAクローンインサートの長さ(cDNA Insert)、PCR反応産物の長さ(After PCR)、cDNAクローンがコードする酵素が関与する反応の説明など)及びプライマーセットに関する情報(例えば、プライマーの塩基配列など)はCD-ROM36 (CD-ROMの代わりにFD、MOなどの媒体でもよい)に記録されており、これらの記録媒体が書籍に付録として添付されている(図5)。図5においては、CD-ROM36は袋37に入れられ、シール38で封をした状態で書籍35に添付されている。この書籍には、さらに、目次、cDNAクローン及びプライ



マーセットを含むスポットの使用説明、記録媒体に記録されている情報へのアクセス方法が印刷されている頁が含まれているとよい。

- [0051] 印刷物の形態としては、1) 百科事典タイプの網羅的なもの(例えば、FANTOMクロン、ヒトメタボロームなど)、2) 分野ごと(例えば、機能別或いは臓器別等)の分冊型、3) 更にテーマというか内容を細分化した1ページから数ページのもの(例えば、ルーズリーフタイプ)、4) より少数の貼付物を想定したカードタイプを例示することができる。
- [0052] さらに、本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を含む試薬キットを提供する。
- [0053] 本発明の試薬キットは、核酸増幅反応(例えば、PCR)キット、蛋白発生キット、抗体キット、その他のキットとして、種々の実験、検査、診断などに利用することができる。
- [0054] 本発明の試薬キットは、上記のような印刷物の形態をとってもよいが、それ以外の形態の例を図6～9に示す。
- [0055] 図6は、本発明の試薬キットにおける、酵素(DNAポリメラーゼ)及びトレハロースの混合物がスポッティングされている紙(支持体)の一例を示す。この紙には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、その他のPCR反応に必要な成分(すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー)とともに、紙の適当な位置にスポッティングされている(以下、このスポットを「DNA Spot」41という)。
- [0056] 図7は、図6に示すDNA Spot41を有する紙42を含む試薬キットの一例を示す。DNA Spot41を有する紙42は遮光ビン51に入れられ、蓋52で密栓をして保管あるいは流通される。試薬キットには、さらに、キットの内容(例えば、キットに含まれる成分・分量、使用目的、保管方法・有効期限、包装単位など)、使用方法、使用上及び取扱い上の注意、問合せ先などの情報が記載された説明書53を含むとよい。説明書53は遮光ビン51に入れてもよいし、遮光ビン51を入れた包装箱(図示せず)に入れてもよい。あるいは、説明書をラベルに印刷して、このラベルを遮光ビン51に貼り付けてもよい。
- [0057] 図8は、本発明の試薬キットにおける、酵素(DNAポリメラーゼ)及びトレハロースの

混合物がスポッティングされている紙(支持体)の一例を示す。この紙62には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、その他のPCR反応に必要な成分(すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー)とともに、紙の適当な位置にスポッティングされている(以下、このスポットを「DNA Spot」61という)。

[0058] 図9は、DNA Spot61を有する紙62を含む試薬キットの一例を示す。DNA Spot61を有する紙62は包装パック71に入れられ、密封して保管あるいは流通される。試薬キットには、さらに、キットの内容(例えば、キットに含まれる成分・分量、使用目的、保管方法・有効期限、包装単位など)、使用方法、使用上及び取扱い上の注意、問合せ先などの情報が記載された説明書72を含むとよい。説明書72は包装パック71に入れてもよいし、包装パック71を入れた包装箱(図示せず)に入れてもよい。あるいは、説明書72をラベルに印刷して、このラベルを包装パック71又は包装箱に貼り付けてもよい。

[0059] 以上、DNAポリメラーゼをDNAと組み合わせた態様について、本発明を説明したが、本発明はこの態様に限定されるわけではなく、種々の酵素への適用が可能である。

[0060] なお、本明細書において、「ー」はその前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

### 発明の効果

[0061] 本発明により、酵素を保存するための簡便な方法が提供された。

[0062] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2003-339542号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

### 図面の簡単な説明

[0063] [図1]DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポッティングされている紙(支持体)の一例を示す。

[図2]DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポッティングされた紙が別紙として添付された学術論文が掲載されている雑誌を示す。

[図3]DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタ

マーなど)とともにスポッティングされた紙を綴じ込んだ書籍の一例を示す。

[図4]DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポッティングされている紙(支持体)を綴じ込んだ書籍の別の態様を示す。

[図5]図4の紙にスポッティングされているcDNAに関する情報が記録されているCD-ROMが袋に入れられ、シールで封をした状態で書籍に添付されている形態を示す。

[図6]DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポッティングされている紙(支持体)の一例を示す。

[図7]図6の紙を含む試薬キットの一例を示す。

[図8]DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アプタマーなど)とともにスポッティングされている紙(支持体)の一例を示す。

[図9]図8の紙を含む試薬キットの一例を示す。

[図10]マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAをクローニングしたpFLCベクターの構成を示す。

[図11]マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA溶液のスポット及びポリメラーゼ+プライマー溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

[図12]図11のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

[図13]プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

[図14]図13のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

[図15]マウスリンゴ酸脱水素酵素、マウスイソクエン酸脱水素酵素(NADP)、マウスイソクエン酸脱水素酵素(NAD)又はマウスオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNA+プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ+PCR用バッファー組成溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

[図16]図15のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を

示す。

[図17]cDNA＋プライマー＋反応促進剤(スperlミジン)＋ポリメラーゼ＋PCR用バッファー組成溶液のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

## 符号の説明

[0064] 1:DNA Spots

2:cDNAクローンがコードするタンパク質(malate dehydrogenaseなどの酵素)の名前

3:cDNAクローンの識別番号

4:cDNAクローンの塩基配列

5:実験の手順の説明文

6:DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アダプターなど)とともにスポットティングされている紙

12:学術論文

13:雑誌

22:書籍

30:DNAがスポットティングされている頁の識別番号

31:DNA Spots

32:スポットを認識するための記号1(列番号)

33:スポットを認識するための記号2(行番号)

34:DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA(cDNA、プライマー、アダプターなど)とともにスポットティングされている頁

35:書籍

36:CD-ROM

37:袋

38:シール

41:DNA Spot

42:紙(支持体)

51:遮光ピン

52: 蓋

53: 説明書

61: DNA Spots

62: 紙(支持体)

71: 包装パック

72: 説明書

発明を実施するための最良の形態

[0065] 以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

### 実施例

[0066] [実施例1]

cDNAクローンとポリメラーゼをスポットしたDNAブック

《プライマーの合成》

下記配列のプライマーセットを従来法により合成した。

プライマーセット1

−21M13: 5′-TGTAACGACGGCCAGT-3′ (配列番号1)

1233-Rv: 5′-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3′ (配列番号2)

《cDNA溶液の調整》

理研クローン (<http://fantom.gsc.riken.go.jp/>) の中から下記の塩基配列で表されるマウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA (クローンID: 1500012M15, 1758bp) をクローニングしたpFLCベクター (図10) を0.1 μg/μl となるようにTE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。

マウスリンゴ酸脱水素酵素1500012M15

```
1 cccggttctc tcccagagtc tgttccgctg tagaggtgac ctgactgctg gagactgcct
61 tttgcaggtg cagagatcgg ccttgcaatt tgcaataatg tctgaaccaa tcagatgcct
121 tgtgactgga gcagctggtc aaattgcata ttactgttg tacagtattg gaaatggatc
181 tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgtgctgttg gacatcaccc ccatgatggg
241 tgttctggac ggtgtcctga tggaactgca agactgtgcc cttccccttc tgcaggatgt
```

301 cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tcctagtggg  
361 ctccatgcc aataagggaag gcatggagag gaaggacctg ctgaaagcca atgtgaaaat  
421 ctcaaatcc cagggcacag ccttggagaa atacgccaag aatcagttg aggtcattgt  
481 tgtgggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagcctcc aagtcagcgc catcgatccc  
541 caaggagaat ttcagttgcc tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaat ctcaaattgc  
601 tcttaaactc ggtgtaaccg ctgatgatgt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc  
661 atcgaccag tatccagatg tcaatcatgc caaggtgaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg  
721 tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggga gagttcatca cgactgtgca  
781 acagcgtggt gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa  
841 agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttgaacc ccagaggag agttcgtgtc  
901 gatgggtgtt atctctgatg gcaactccta tgggtgccct gatgacctgc tctactcatt  
961 cctgtcgtg atcaagaata agacctggaa gtttgtgaa ggcctcccca ttaatgactt  
1021 ctcccgtaaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgcttt  
1081 tgagtttctc tcctctcggt gactagacac tcgttttgac atcagcagac agccgaaggc  
1141 tgaggaatca aaatgtcgtc ttgagccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa  
1201 ttgtgaacag caaaatattt taaatagtgt gtgctttatg atttgtgaaa gtctatcatg  
1261 ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt  
1321 ctactttata ttagtatct tcaggaaaac aagtttgccc aatagattat aattttactt  
1381 ttttaattga ctaaaagaaa taaagatgga aaatattatg aagtaaagca ttagtctcta  
1441 acataaaca ggaagcccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt ccttaaaggt  
1501 tggttcatgt ttgtctcata atttgatttt aaaattagct gtaagaaggt tgcagataat  
1561 ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtcatt aatatttgat agccaataat  
1621 accacactat taatatttgt aagctaagat tattagaaac ataaaactgt ttttagtca  
1681 gtctgttttc catgagaaga catgcatcat ctttgtgtgt tttgtgcatt actcagtgc  
1741 ataaataacc ataactc (配列番号3)

《ポリメラーゼ+プライマー溶液の調整》

KOD plus (東洋紡製), トレハロース, プライマーセット1を混合し, 最終濃度25 U/ $\mu$   
l KOD plus DNA polymerase, 0.1 Mトレハロース, 2  $\mu$  Mプライマーセット1となるよう

に調整した。

#### 《DNAのスポッティング》

60MDP紙(三島製紙製)に調整したcDNA溶液とポリメラーゼ+プライマー溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)を用いて、図11に示すように、スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。cDNA溶液は0.5  $\mu$ l/スポット、ポリメラーゼ+プライマー溶液は1  $\mu$ l/スポットとなるようにした。

#### 《DNAの回収と増幅》

スポッティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後、スポットしたcDNAおよびポリメラーゼ+プライマーを含むようにそれぞれ4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れた。PCR反応溶液(10 mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KCl, 5.3 mM MgCl, 200  $\mu$ M 各dNTP) 25  $\mu$ lをチューブに加え、次の条件でPCRを行った。

2min at 94°C

(1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 75sec at 68°C) 29サイクル

15 min at 74°C

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図12に示す。1800bp付近に見られるバンドが目的とする断片と考えられ、60MDP紙からDNAが溶出し、そのDNAはPCRにより増幅可能であることが判った。

#### [実施例2]

##### # 黄体ホルモン遺伝子を使ったアプタマー+ポリメラーゼの実験

#### 《プライマーの合成》

下記配列のプライマーを従来法により合成した。

プライマーセット1(ヒト黄体形成ホルモン遺伝子エクソン1増幅するプライマーセット)

HsLH1F:CCAGGGGCTGCTGCTGTTG(配列番号4)

HsLH1R:CATGGTGGGGCAGTAGCC(配列番号5)

プライマーセット2(ヒト黄体形成ホルモン遺伝子エクソン2増幅するプライマーセット)

HsLH2F:ATGCGCGTGCTGCAGGCG(配列番号6)

HsLH2R: TGCGGATTGAGAAGCCTTTATTG (配列番号7)

#### 《アプタマーの合成》

次に既知のTaq DNA polymeraseに対するアプタマー (Yun Lin, Sumedha D.

Jayasena Inhibition of Multiple Thermostable DNA Polymerases by a Heterodimeric Aptamer Journal of Molecular Biology (1997), Vol. 27, Issue 1, pages 100-11) である下記配列を持つオリゴヌクレオチドを従来法により合成した。

GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC (配列番号8)

#### 《プライマー＋アプタマー＋ポリメラーゼ溶液の調整》

2種類のスポッティング用溶液を調整した。

上記のプライマーセット, Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, およびTaq DNA polymeraseを最終濃度, 2  $\mu$  Mプライマーセット, 2  $\mu$  M Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, 25 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase, 0.1 Mトレハロースとなるように混合, 調整した溶液, およびこの組成よりTaq DNA polymeraseに対するアプタマーのみを除いた組成の溶液を調整した。

#### 《DNAのスポッティング》

60MDP紙(三島製紙製)に上記により調整したプライマー＋アプタマー＋ポリメラーゼ溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)を用いて, 図13に示すように, スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポッティング用溶液は1  $\mu$ l/スポットとなるようにした。

#### 《DNAの増幅》

スポッティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後, スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れた。PCR反応溶液(10 mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KCl, 5.3 mM MgCl, 200  $\mu$  M 各dNTP) 25  $\mu$  lと50 ngテンプレートDNA(ヒトゲノムDNA, BD Biosciences Clontech, US社製)をチューブに加え, 次の条件でPCRを行った。

3min at 94°C

(30 sec at 94°C, 30 sec at 40°C, 30 sec at 72°C) 50サイクル

15 min at 72°C



反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図14に示す。184bpおよび343bp付近に見られるバンドがそれぞれエクソン1および2の目的とするDNA断片と考えられ、60MDP紙に固定されたプライマーを用いてテンプレートDNAからPCRにより目的とする断片を増幅可能であることが判った。また、Taq DNA polymeraseに対するアダマーの有無を比較すると、アダマーを含む反応の方が非特異的な増幅を抑えることが出来ることが判った。

### [実施例3]

# 理研cDNAクローン+PCR溶液をスポットしたDNAブック

#### 《プライマーの合成》

下記配列のプライマーセットを従来法により合成した。

#### プライマーセット1

−21M13:5′-TGTAACGACGGCCAGT-3′ (配列番号1)

1233-Rv:5′-AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3′ (配列番号2)

#### 《cDNA溶液の調整》

理研クローン (<http://fantom.gsc.riken.go.jp/>) の中から下記の塩基配列で表されるマウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA (クローンID:1500012M15, 1758bp), マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) (クローンID:1500012E04, 2440bp), マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) (クローンID:E030024J03, 2160bp), マウスオキシグルタル酸脱水素酵素 (クローンID:E430020N12, 3554bp) をクローニングしたpFLCベクター (図10) を1  $\mu$ g/ $\mu$ l となるようにTE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。

#### マウスリンゴ酸脱水素酵素1500012M15

```
1  cccggttctc tcccagagtc tgttccgctg tagaggtgac ctgactgctg gagactgcct
61  ttgcaggtg cagagatcgg ccttgcagtt tgcaataatg tctgaaccaa tcagagtcct
121 tgtgactgga gcagctggtc aaattgcata ttcactgttg tacagtattg gaaatggatc
181 tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgtgctgttg gacatcaccc ccatgatggg
241 tgttctggac ggtgtcctga tggaactgca agactgtgcc ctcccccttc tgcaggatgt
301 cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tcctagtggg
361 ctccatgcca ataagggaag gcatggagag gaaggaccta ctgaaagcca atgtgaaaat
```

421 cttcaaatcc cagggcacag ccttgagaa atacccaag aaatcagta aggtcattgt  
481 tgtgggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagcctcc aagtcagcgc catcgatccc  
541 caaggagaat ttcagttgcc tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaat ctcaaattgc  
601 tcttaaactc ggtgtaaccg ctgatgatgt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc  
661 atcgaccag tatccagatg tcaatcatgc caagtgaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg  
721 tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggga gagttcatca cgactgtgca  
781 acagcgtggt gctgctgtca tcaaggtcgc gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa  
841 agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttgaacc ccagaggag agttcgtgtc  
901 gatgggtgtt atctctgatg gcaactccta tgggtgccct gatgacctgc tctactcatt  
961 ccctgtcgtg atcaagaata agacctggaa gtttgtgaa ggcctcccca ttaatgactt  
1021 ctcccgtaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgctt  
1081 tgagtttctc tcctctcgt gactagacac tcgttttgac atcagcagac agccgaaggc  
1141 tgaggaatca aaatgtcgtc ttgagccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa  
1201 ttgtgaacag caaaatattt taaatagtgt gtgctttatg atttgtgaaa gtctatcatg  
1261 ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt  
1321 ctactttata ttagtatctc tcaggaaaac aagtttgccc aatagattat aattttactt  
1381 ttttaattga ctaaaagaaa taaagatgga aaatattatg aagtaaagca ttagtctcta  
1441 acataaacia ggaagcccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt ccttaaaggt  
1501 tggttcatgt ttgctcata atttgatttt aaaattagct gtaagaaggt tgcagataat  
1561 ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtcatt aatatttgat agccaataat  
1621 accacactat taatatttgt aagctaagat tattagaaac ataaaactgt tttgagtca  
1681 gtctgttttc catgagaaga catgcatcat ctttgtgtgt tttgtgcatt actcagtga  
1741 ataaataacc ataatctc (配列番号3)

マウスイソクエン酸脱水素酵素(NADP) 1500012E04

1 gggtgttgcc gctgtcgccg cggtagggga agtggacgcg atggccgggt ccgcgtgggt  
61 gtccaaggctc tctcggtgc tgggtgcatt ccacaacaca aaacaggtga caagagggtt  
121 tgctggtggt gttcagacag taactttaat tcctggagat ggaattggcc cagaaatttc  
181 agcctcagtc atgaagattt ttgatgctgg ccaaagcacc tattcagtgg gaggagcgca

241 atgtcacagc aattcaagga ccaggaggaa agtgggatga tccctccaga agccaaggag  
301 tccatggata agaacaagat gggcttgaaa ggcccactaa agaccccaat agccgctggc  
361 catccatcta tgaatctgtt gcttcgtaag acatttgacc tttatgcaa tgtccggcca  
421 tgtgtctcaa ttgaaggta taaaaccctt tacacggatg taaatatcgt caccatccga  
481 gagaacacgg aaggagaata cagtgaatt gagcatgtga tcgttgatgg gggtgtgcag  
541 agcatcaagc tcacaccga agaagcaagc aagcgattg cagagtttgc cticgagtac  
601 gctcggaaca accaccggag caacgtcaca gctgtgcaca aagctaacat catgaggatg  
661 tcagatgggc tctttctgca aaaatgcagg gaagttgcgg agaactgtaa agacattaaa  
721 ttaacgaga tgtacctga tactgtatgt ttaaataatg tacaagacc atcccagttt  
781 gatgttcttg tcatgcaaaa ttatcacgga gacatcctta gtgatctgtg tgcaggactg  
841 attggaggtc ttgggtgac tccaagtggc aatattggag ccaacgggtg tgccatcttt  
901 gaatcgggtc atggaacagc cccggacatt gcaggcaagg acatggccaa cccacggcc  
961 ctctgctta gtgctgtgat gatgcttcgc cacatgggac ttttgacca tgcagcaaaa  
1021 atcagggctg catgttttgc tacaattaag gatggaaaga gcttaacaaa agatctggga  
1081 ggcaacgcga agtgctctga cttcacagaa gaaatctgtc gtagagtcaa agacttagat  
1141 tagcactcct gctggtgat ttgctgcagt cagtcaatca ctccaaaagg ataccctgta  
1201 atcctccttg agggcgccca ccattgggtt gcttgcttct tgacagagta cgtttttga  
1261 atctggcctt ttcttaacaa aacccttgca atggatgcac atgatggccc caggccttca  
1321 ttcaaagggt ttcccaagt gctggttga tttattgtcc gtctggtaaa ccttattttg  
1381 taaactgtaa gtgaactgta tcatttatca ttgttaacc attttacact tcaggcaaaa  
1441 tcattttcct caactgtaaa tattctgata cagaattaat aagagaagat atttaacttt  
1501 ttaacaaaag ccctggatgt ttggtttatg aaaaacaaac tgggaataaa acagggtttc  
1561 aacaatcgca caagataaca ttattctaata actaatgggt acaaaagaaa ttactggga  
1621 aagttcacag caaaaaactg gtatatttct taaaaatatg gaaataaagt atttgccta  
1681 tacatgaatt actattaata aaaatgtaag ctccaagaaa tccataatga atgatgtaat  
1741 tttgttacta catcggtaat ccttgtaag gccccggatg ctctctgtgt atttgattct  
1801 ttggttacct tgagattcac ttttggggg gaagagcttt cagataagg agatcactcc  
1861 tcactagaca gatcgtcagc attgcgagct gtcagccatg agagccagcc actgcagatc

1921 ccctcccacg tggccacact ccagccagtg ctgcaggtga ccctggaaag gcctggctgc  
1981 cccttgactt tccctaaagc aaccagtcac tgccttctgc ccagtagca cccattacag  
2041 acttaattgc cgaggtggag ctgactcagc ccacgctcat acaaatcagg ccaagcgggg  
2101 gcctgtgtta ccagctgctg accatcaggt tctgcccctc attcttccca cagcctctgc  
2161 tccacagcat gaacctagcc ttggtccac accaaagcca agctgtcttc ccttagccct  
2221 tgactagtt tgcaaaactcg tggctttgca taatgtacc tggtcccaag gggatttctt  
2281 aacaacagat gtccctgtct gggctatctt tttaaagctt ttatttgac ttacaatctt  
2341 ctgtgtatct tactttaaaa ctgtgcttt ccctgtctca ctggattgtt ctggttagca  
2401 gtggctttgg gttcacagta ataaagaact taagaact (配列番号9)

//

マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) E030024J03

1 ggatctaact ggggccggct tattacagct tgtgtgtacg cgcgggtgtg agccgggtta  
61 ttgaagtaaa aatgtccaga aaaatccaag gaggttctgt ggtggagatg caaggagatg  
121 aatgacacg aatcatttgg gaattgatta aggaaaaact tattcttccc tatgtggaac  
181 tggatctgca tagctatgat ttaggcatag agaatcgtga tgccaccaat gaccaggtca  
241 ccaaagatgc tgcagaggct ataaagaaat acaacgtggg cgcaagtgt gctaccatca  
301 ccccgatga gaagagggtt gaagaattca agtgaaca aatgtggaaa tccccaaatg  
361 gcaccatccg aaacattctg ggtggcactg tcttcaggga agctattatc tgcaaaaata  
421 tccccggct agtgacaggc tgggtaaaac ccatcatcat tggccgacat gcatatgggg  
481 accaatacag agcaactgat ttgtgttct ctgggcctgg aaaagtagag ataacctaca  
541 caccaaaaga tggaactcag aaggtgacat acatggtlaca tgactttgaa gaaggtgggtg  
601 gtgttgccat gggcatgtac aaccaggata agtcaattga agactttgca cacagttcct  
661 tccaaatggc tctgtccaag ggctggcctt tgtatctcag caccaagaac actattctga  
721 agaagtatga tgggcgttct aaagacatct tccaggagat ctatgacaag aaatacaagt  
781 ccagtttga agctcagaag atctgctatg aacacaggct catagatgac atggtggccc  
841 aagctatgaa gtccgaggga ggcttcatct gggcctgtaa gaattacgat ggggatgtgc  
901 agtcagactc agtcgccccaa gggtatggct cccttggcat gatgaccagt gtgtgattt  
961 gtccagatgg taagacggtga gaagcagagg ctgcccattg cactgtcaca cgtcactacc

1021 gcatgtacca gaaagggcaa gagacgtcca ccaaccccat tgcttcatt ttgcctgg  
1081 cccgagggtt agccacaga gcaaagcttg ataacaatac tgagctcagc ttcttcgcaa  
1141 aggctttgga agacgtctgc attgagacca ttgaggctgg cttatgact aaggacttg  
1201 ctgcttgcatt taaaggctta ccaatgtac aacgttctga ctacttgaat acatttgagt  
1261 ttatggacaa acttgagaa aactgaagg ccaaattagc tcaggccaa actttaagg  
1321 caaacctggg cttagaatga gtctttgcgg taactaggc cacaggttta cgtattttt  
1381 tttttttt tagtaacact caagattaaa acaaaaaatc attttgtaat tggtttagaa  
1441 gacaaagtg aactttata tatgtttaca gtctttttc ttttcatac agttattgcc  
1501 acctaatga atgtgtggg gaaattttt taattgtatt ttattgtga gtagcagtg  
1561 aggaattatg ttagtacctg ttcacaatta actgtcatgt tttctcatgc tctaattga  
1621 atgacaaaa tcagaagtgc tccaagggtg aacaatagct acagtatgt tccccataag  
1681 gggaaaagag aaactcactt cccctgttgt ccatgagtgt gaacactgg gcctttgtac  
1741 gcaaatgtg tactgttgt gggagagcta tacagtaagc tcacataaga ctggaacaga  
1801 taggatgtgt gtagctaaaa tgcattggcag acgtgtttat aaagagcatg tatgtgtcca  
1861 atatactagt tatattttta gaccactgga gaattccaag tctagaataa atgcagactg  
1921 gaggattctg ctctttgatt tctcttctcc tgtgaccag cctaagtatt atcctacccc  
1981 aagcagtaaa tttcacccat gggcaataat gggagctgta ccgtttggat ttctgtgac  
2041 ctgctgcatt tctttatat aaatgtgact ttttttccc agaagttgat attaaacact  
2101 attccagtct agtccttcta aactgttaat ttaattaaa atgaagtact aatgactct  
(配列番号10)//

マウスオキシグルタル酸脱水素酵素E430020N12

1 gggggtggag ctgaacggga gacaggtact tgtggaaggc ttcaggacaa aatgtttcat  
61 ttaaggactt gtgctgctaa gtaaggcca ttgacagcct cccagactgt taagacattt  
121 tcacaaaaca aaccagcagc aattaggacg tttcaacaga ttcggtgcta ttctgcacct  
181 gtagctgctg aaccatttct tagtgggact agttcgaact atgtggagga aatgtactgt  
241 gcctggttgg agaattccaa aagtgtacat aagtcatggg acatttttt ccgaaacacc  
301 aatgctggag cccacccggg cactgcctac cagagccccc tttccctgag tcgaagctcc  
361 ctggctacca tggcccatgc acagtccctg gtggaagcac aacctaactg cgacaaactc

421 gtggaggacc acttggcggg gcagtctctc atcagggcat atcagatacg agggcaccat  
481 gtagcacagc tggaccccct ggggattttg gatgctgac tggactctc cgtgcccgt  
541 gacattatct catccacaga caaacttggg ttctatggcc tacacgagtc tgacctgac  
601 aaggcttcc acttaccac caccatttc atcgggggac aggagccagc acttctctt  
661 cgggagatca tccgtcggct ggagatggcc tactgccagc acattggtgt ggagttcatg  
721 ttcattaatg atttgaaca atgccagtgg atccgacaga agtttgagac ccttgaac  
781 atgcagttca ccaatgagga gaagcggacc ttgctggcca ggcttgtagc atccaccagg  
841 tttgaggagt tcctacagcg aaagtggctc tcggagaagc gttttggtct ggaaggctgt  
901 gagtgctga tccctgccct caagacaatc attgatatgt caactcagat gaccctgaag  
961 ctgtcatgta tgtatgaag gtggcagctg agtggagaaa cacctccac aaggatgttg  
1021 tagttgatct ggtgtgttat cgacgaaatg gccacaatga gatggacgaa cctatgttta  
1081 cacagccact catgtacaag cagatccgca agcagaagcc tgtactgcag aagtatgcag  
1141 aattgctagt ctcccagggt gtcgtcaatc agcctgagta cgaggaggaa atctccaagt  
1201 atgataagat ctgtgaggaa gcattacca gatccaaaga tgagaagatc ttgcacatca  
1261 agcactggct ggattcccc tggcctggct ttttaccct ggatggacag cccaggagca  
1321 tgacctgcc ctccactggc ctggaggagg atgtcttgtt ccacattgga aaggtagcca  
1381 gctctgtacc tgtggagaac ttactatcc atggagggt gagccggatc ttgaagacc  
1441 gcagagagct tgtacgaac cggactgtgg actgggccct ggagagtagc atggcatttg  
1501 gctcactgct gaaggaaggc atccatgtgc ggctgagtgg ccaggatgtg gagcggggca  
1561 ccttcagcca tcgccaccat gtgtccatg atcagaatgt tgacaaaaga acctgcatcc  
1621 ccatgaacca ctttggcca aatcaggccc ctacactgt atgcaacagc tcgtgtctg  
1681 agtacggtgt cctgggctt gagctgggt ttgcatggc tagccctaat gctctggtc  
1741 tctgggaggc ccagtttggg gacttcaaca acatggcaca gtgcatcatt gaccagttca  
1801 tctggccagg acaggcaaag tgggtgcggc agaattggcat tgtgtctctg ctgctcatg  
1861 gcatggaagg catgggtccc gagcattcct ctgaccgccc agagcggttt ctgcatatg  
1921 gcaatgatga ccatatgtc ctgctgact tgcaggaaga actctttgac atcaatcagc  
1981 tatatgactg caactggatt gttgtcagct gttccaccg tggcaacttc ttccatgtgc  
2041-tgcgacaaca gatcttctg ccttccgta agccgttaat agtcttcaact cccaaatccc

2101 tcttgcgcca ccgtgaggca agaactatct ttgacgatat gttgccagga acgcacttcc  
2161 agcgtgtgat cccagaaaat ggacatgcag ctcaggaccc tcacaaagtc aagagacttc  
2221 tcttctgcac tgggaaggtg tactatgacc tcacccgaga gcgcaaagcc aggaacatga  
2281 aggaggaggt ggctattaca aggattgagc agctatcacc attccccttt gacctcctgt  
2341 tgaaagaggc tcagaagtat cccaatgctg agctggcctg gtgccaggaa gagcacaaga  
2401 accaaggcta ctatgactat gtcaagccaa gacttcgtac caccattgac cgtgctaagc  
2461 ctgtctggta tgctgtccga gacccggcag ctgctccagc cactggcaac aagaaaacac  
2521 acctgacaga gctgcagcgc ttctggaca cagccttga cctggacgca ttcaagaaat  
2581 tctcttagat gctcctggag ttgatgaggc catggccccc atgtccatga cgctctttgc  
2641 ttctcaacta aagaatagt cctcagcact gtccacacgt cccttcgctg tgccacacca  
2701 cccctgttct cataggaatt aagttgtcca ctgcagtgt cagctgtcc ccggtcacat  
2761 gctgcccagc ctgtgccgac ttctctcagg ctgcacaccg ttcattggaga ccggaaggag  
2821 cagaataagg aaagggcccc tctcaggaca tcctagagaa ggaaggcagc tctggcccca  
2881 cccatgcccc cagtgcaatc ctccagggtg ggaacagAAC cctatgtggc ttcccagggt  
2941 actagcactc agccctcgtc acccatcaag tcgcagattc aaggccagga gtatgttcat  
3001 cttgctaggg ccaagctgag agctcatgga ggaactatag ctgccaggat ttgggagtca  
3061 tcaggatgtt gtgtgaatag agattgtcat ggggtattta gaggacttta gcagtgtgt  
3121 tagtctagcc ctgctaccct tcttgggtt gggctgtatg tgggaaactt accccagcta  
3181 ccacgcctgg agagcttggc tctgagtacg gccagaagc tccattggct cccaacgcca  
3241 ggcactgctg cctcttggtc ctgctgcctc tgctctcctg acccctcccc agtcacttca  
3301 ttttctctgt tgttccttg aacacacaga agctgttgac gaattctttt ttttctgtg  
3361 ccaaggcagg tcaaaagcag atcagtggat aagagcaagt tgtccaagg agccagctgt  
3421 ccttctctcc tcttttgacc tccactggga cacacctgat ttatttattt tggttaaaaa  
3481 aaaaaaggaa atgaaaaaag aacaaccacc ttgcatgtc atcggcttga ccataaact  
3541 aagttatcat ggtc (配列番号11)

//

《cDNA＋プライマー＋アダマー＋ポリメラーゼ＋PCR用バッファー組成溶液の調  
整》

上記cDNA, プライマーセット1, Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, および Taq DNA polymeraseを最終濃度, 5  $\mu$ M プライマーセット1, 5  $\mu$ M Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, 50 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase, 0.1 Mトレハロース, 250 mM Tris-HCl(pH8.3), 1.25 M KCl, 132.5 mM MgCl, 5  $\mu$ M 各dNTPとなるように調整した。

#### 《DNAのスポットティング》

60MDP紙(三島製紙製)に上記により調整した溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)を用いて, 図15に示すように, スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポットティング用溶液は1  $\mu$ l /スポットとなるようにした。

#### 《DNAの増幅》

スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後, スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れ, そこに水25  $\mu$ lを加え, 次の条件でPCRを行った。

2min at 94°C

(1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 75sec at 68°C) 29サイクル

15 min at 74°C

反応後のチューブより適量を取り, 1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図16に示す。Lane 1はリンゴ酸脱水素酵素のcDNA、Lane 2はイソクエンサン脱水素酵素(NADP)のcDNA、Lane 3はイソクエンサン脱水素酵素(NAD)のcDNA、Lane 4はオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNA、左端はサイズマーカーを示す。4種類のcDNAについてそれぞれ目的とする長さの断片が得られ, 60MDP紙に固定したcDNA, プライマー, アプタマー, ポリメラーゼ, およびPCR用バッファー組成物に水のみを加えることによりPCR増幅が可能であることが判った。

反応後のチューブより適量を取り, 1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図108に示す。184bpおよび343bp付近に見られるバンドがそれぞれエクソン1および2の目的とするDNA断片と考えられ, 60MDP紙に固定されたプライマーを用いてテンプレートDNAからPCRにより目的とする断片を増幅可能であることが判った。また, Taq DNA



polymerase)に対するアプタマーの有無を比較すると、アプタマーを含む反応の方が非特異的な増幅を抑えることが出来ることが判った。

#### [実施例4]

##### 《cDNA溶液の調整》

実施例3で使用したのと同じマウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAクローン(クローンID: 1500012M15, 1758bp)をクローニングしたpFLCベクター(図10)を1  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE(10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA)に溶解した。

##### 《cDNA+プライマー+反応促進剤(スペルミジン)+ポリメラーゼ+PCR用バッファー組成溶液の調整》

上記cDNA, プライマーセット1, スペルミジンおよびTaq DNA polymeraseを最終濃度, cDNA 0.005  $\mu$ g/ $\mu$ l, 5  $\mu$ Mプライマーセット, 50 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase, スペルミジン100 mM, 0.1 Mトレハロース, 250 mM Tris-HCl(pH8.3), 1.25 M KCl, 132.5 mM MgCl, 5  $\mu$ M 各dNTPとなるように調整した。

##### 《DNAのスポッティング》

60MDP紙(三島製紙製)に上記により調整した溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)を用いて、図15に示すように、スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポッティング用溶液は1  $\mu$ l/スポットとなるようにした。

##### 《DNAの増幅》

スポッティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後、スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れ、そこに水25  $\mu$ lを加え、次の条件でPCRを行った。

2min at 94°C

(1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 75sec at 68°C) 29サイクル

15 min at 74°C

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図17に示す。Lane 1および2はcDNA, プライマー, ポリメラーゼ, 反応促進剤としてポリアミンの一種であるスペルミジン, およびPCR用バッファー組成物を60MDP紙固定したサ

ンプルで、Lane3はスペルミジンのみ除いた組成を固定したサンプルである。どちらも、水を加えることにより、固定されたDNAを増幅することが可能であり、また、反応促進剤を固定したサンプルでは、増幅反応が促進されていることが判った。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

### 産業上の利用可能性

- [0067] 本発明の支持体は、酵素の保存や流通に利用することができる。また、印刷物及び試薬キットへの応用も可能である。

### 配列表フリーテキスト

- [0068] 配列番号1は、プライマー-21M13の塩基配列を示す。  
配列番号2は、プライマー1233-Rvの塩基配列を示す。  
配列番号3は、マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAの塩基配列を示す。  
配列番号4は、プライマーHsLH1Fの塩基配列を示す。  
配列番号5は、プライマーHsLH1Rの塩基配列を示す。  
配列番号6は、プライマーHsLH2Fの塩基配列を示す。  
配列番号7は、プライマーHsLH2Rの塩基配列を示す。  
配列番号8は、Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの塩基配列を示す。  
配列番号9は、マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) のcDNAの塩基配列を示す。  
。  
配列番号10は、マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) のcDNAの塩基配列を示す。  
。  
配列番号11は、マウスオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNAの塩基配列を示す。

### 請求の範囲

- [1] 酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。
- [2] 上記保護剤がトレハロース及びその誘導体からなる化合物群より選択される少なくとも一種の化合物である請求項1記載の支持体。
- [3] 酵素反応の促進剤をさらに含む請求項1又は2に記載の支持体。
- [4] 上記酵素に対するアプタマーをさらに含む請求項1ないし3の何れか一項に記載の支持体。
- [5] 酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体。
- [6] 上記酵素がDNAポリメラーゼである請求項1ないし5の何れか一項に記載の支持体。
- [7] さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含んでなる請求項6記載の支持体。
- [8] さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応の鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含んでなる請求項6に記載の支持体。
- [9] 請求項1ないし8の何れか一項に記載の支持体を含む印刷物。
- [10] 請求項1ないし8の何れか一項に記載の支持体を含む試薬キット。
- [11] 請求項1記載の支持体を製造する方法であって、酵素及び保護剤の混合溶液を調製し、該溶液を支持体に適用し、該支持体を乾燥することにより、前記酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定することを含む前記の方法。
- [12] 請求項1ないし8の何れか一項に記載の支持体を液体に浸漬させることにより、該液体中に酵素を溶出させることを含む、支持体に固定された酵素を再生する方法。
- [13] 請求項6ないし8の何れか一項に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法。

[図1]

6

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase

Clone ID: 1500012M15

DNA sequence

.....

.....

.....

.....

.....

4

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)

Clone ID: 1500012E04

DNA sequence

.....

.....

.....

.....

.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)

Clone ID: E030024J03

DNA sequence

.....

.....

.....

.....

.....

Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)

Clone ID: E430020N12

DNA sequence

.....

.....

.....

.....

.....

**Procedures**

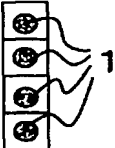
To amplify cDNA inserts, cut out the 4 mm X 4 mm area spotted with DNA, place it into a PCR tube, add 25  $\mu$  of water, centrifuge the resulting solution, and then initiate PCR cycle. The spot contains Taq DNA polymerase, an aptamer against the Taq DNA polymerase, trehalose, a PCR buffer, PCR primers (-21M13: 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3', 1233-Rv:5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'), each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and MgCl<sub>2</sub>. After centrifuging the resulting solution, the PCR cycle is initiated. PCR cycles comprise 2 min at 94°C, 29 cycles of denaturing (94°C, 1 min), annealing (60°C, 1 min) and extension (68°C, 75 sec), and 15 min at 74°C.

Clone 1

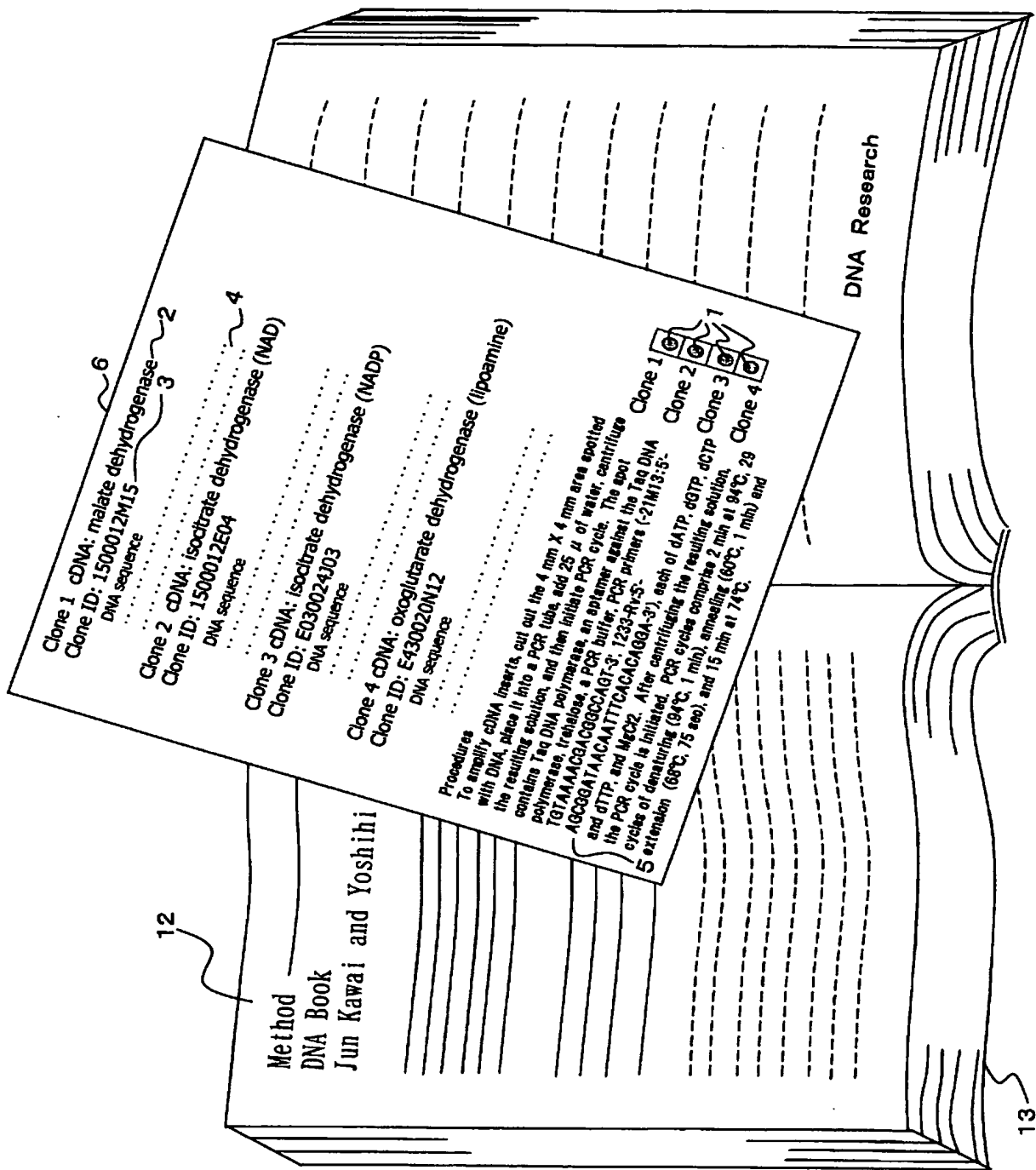
Clone 2

Clone 3

Clone 4



[図2]



[ 3 ]

6

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase

Clone ID: 1500012M15

DNA sequence

.....

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)

Clone ID: 1500012E04

DNA sequence

.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)

Clone ID: E030024J03

DNA sequence

.....

Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)

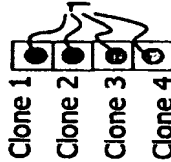
Clone ID: E430020N12

DNA sequence

.....

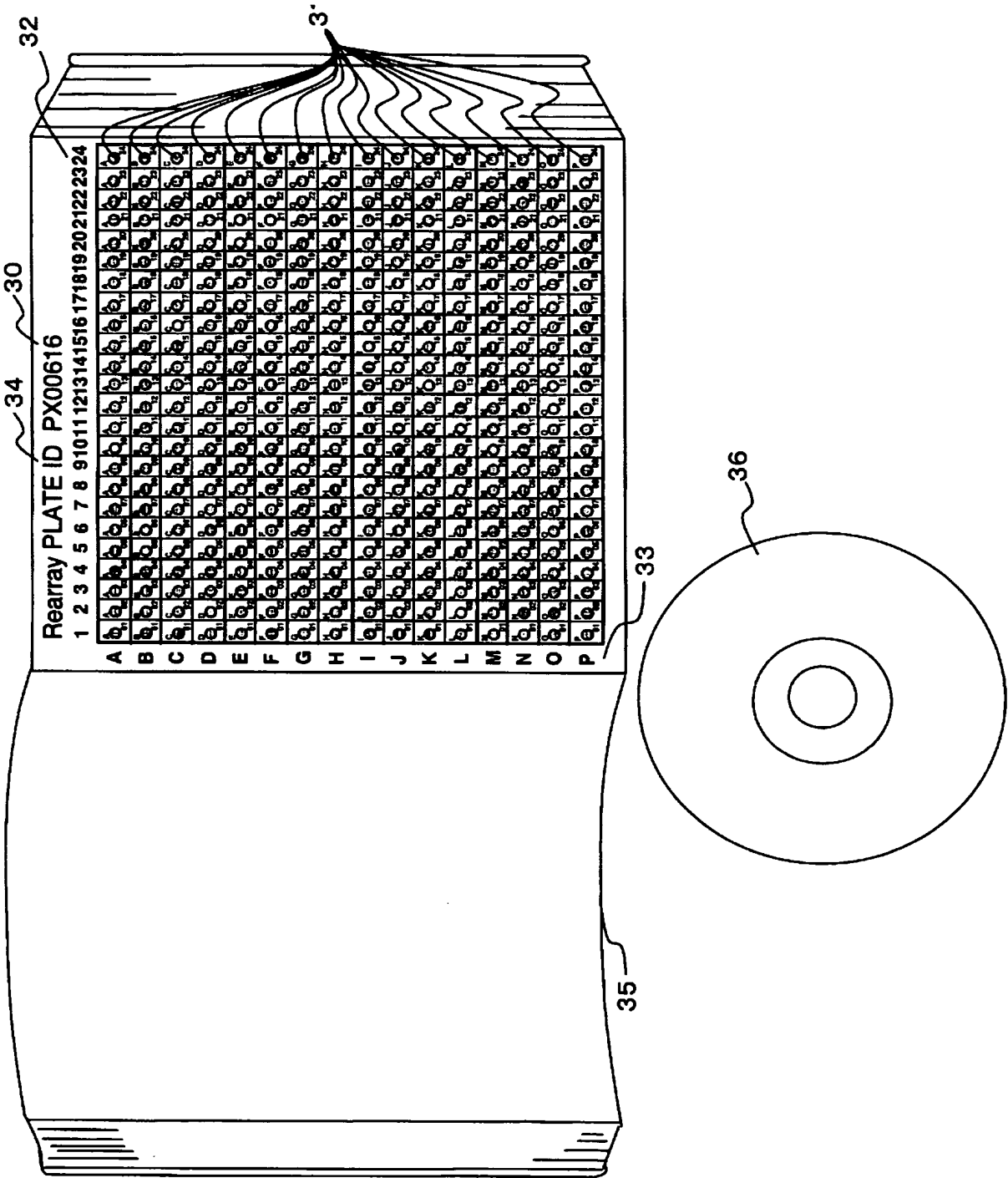
Procedures

To amplify cDNA inserts, cut out the 4 mm X 4 mm area spotted with DNA, place it into a PCR tube, add 25  $\mu$  of water, centrifuge the resulting solution, and then initiate PCR cycle. The spot contains Taq DNA polymerase, an aptamer against the Taq DNA polymerase, trehalose, a PCR buffer, PCR primers (5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3', 1233-RV:5'-AGCGGATAACAAATTCACACAGGA-3'), each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and MgCl<sub>2</sub>. After centrifuging the resulting solution, the PCR cycle is initiated. PCR cycles comprise 2 min at 94°C, 29 cycles of denaturing (94°C, 1 min), annealing (60°C, 1 min) and extension (68°C, 75 sec), and 15 min at 74°C.

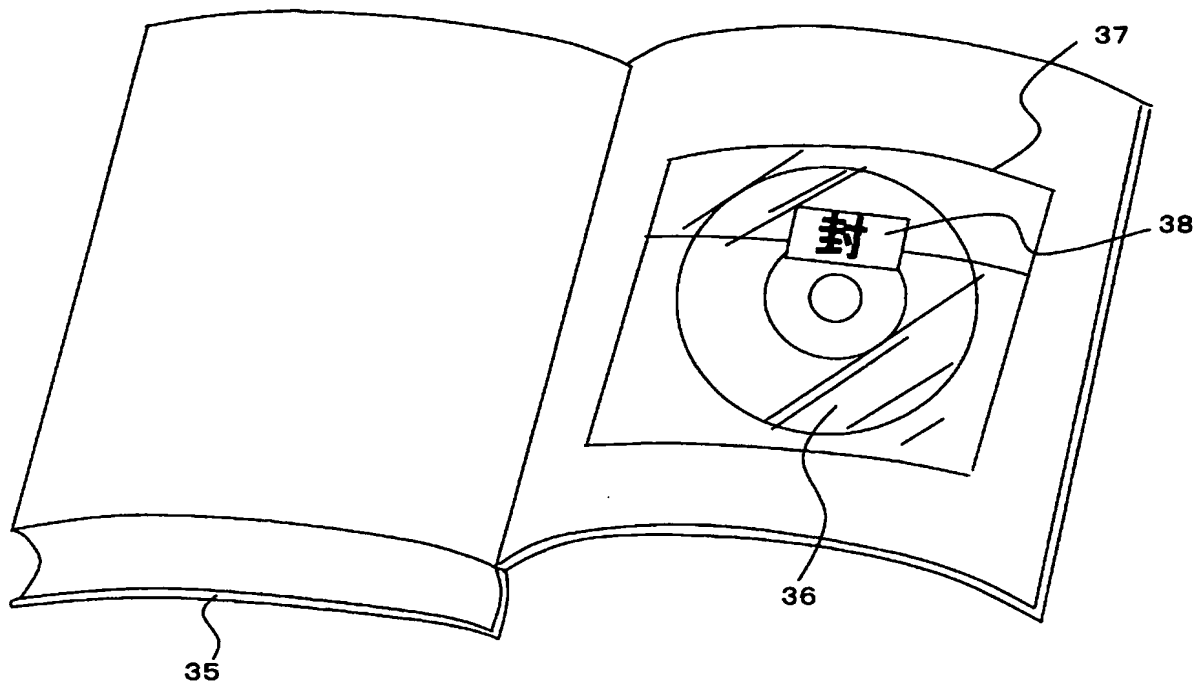


22

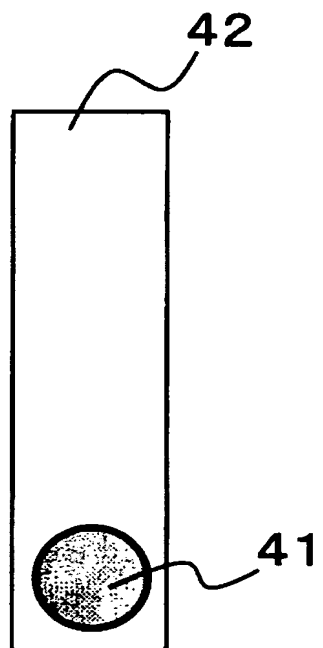
[図4]



[図5]

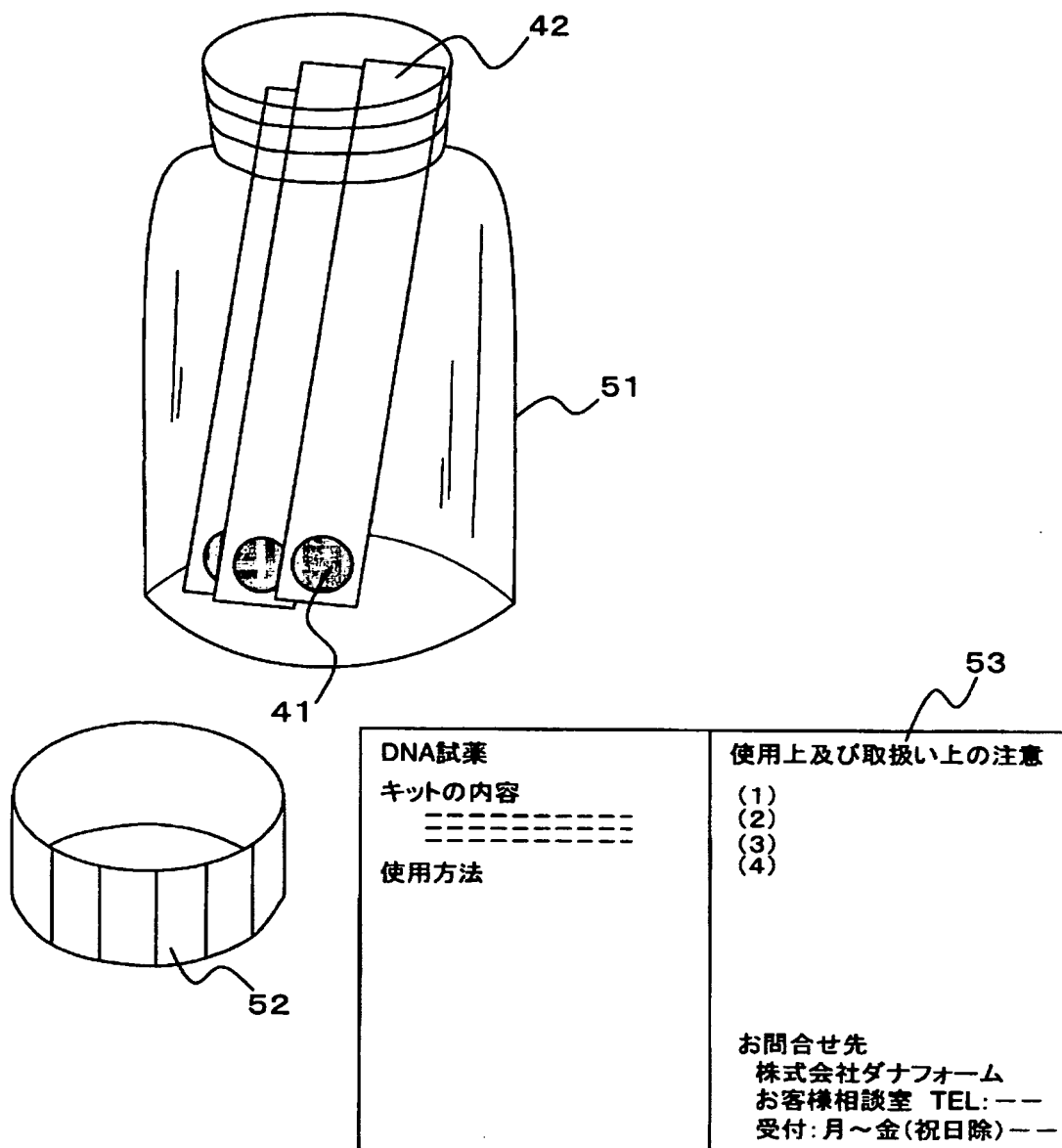


[図6]

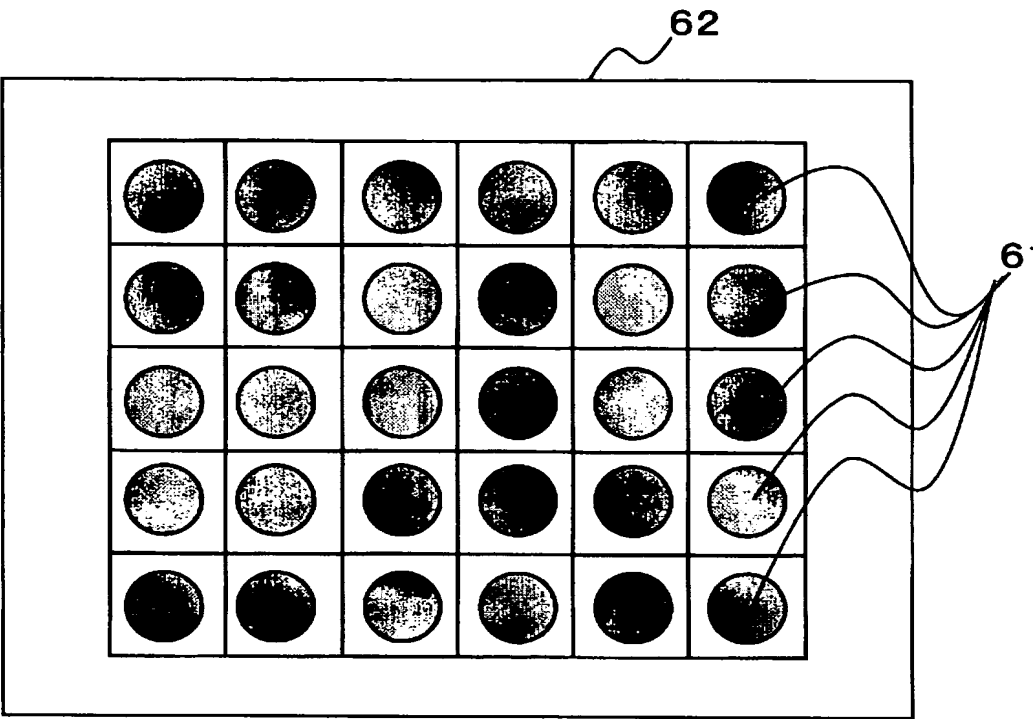




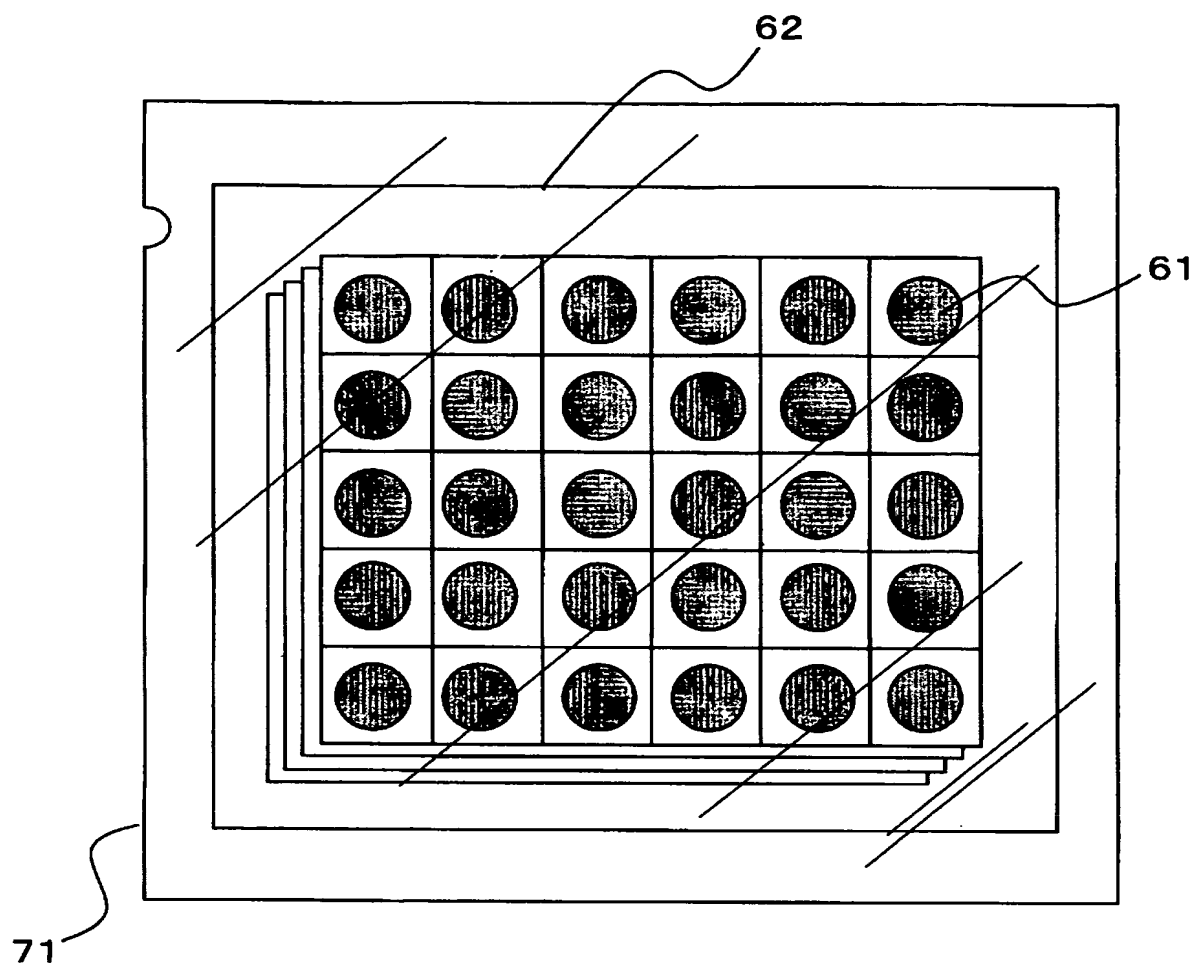
[図7]



[図8]



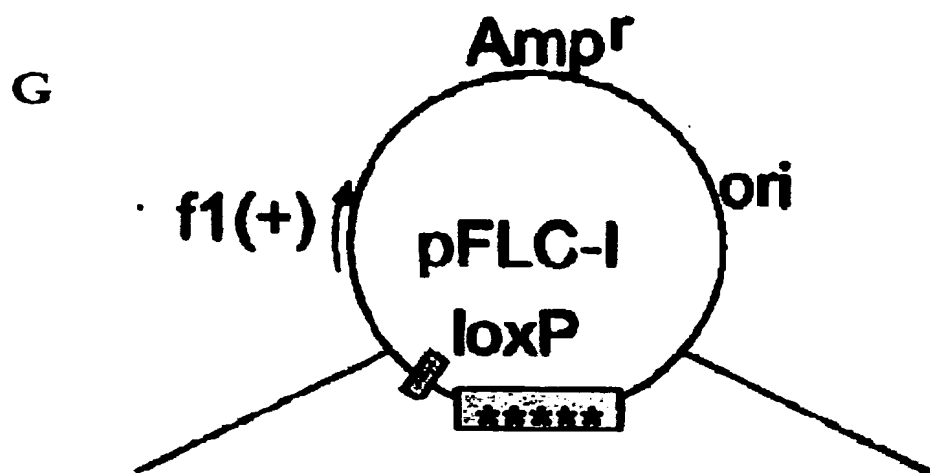
[図9]



<p><b>DNA試薬</b></p> <p><b>キットの内容</b></p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p><b>使用方法</b></p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	<p><b>使用上及び取扱い上の注意</b></p> <p>(1) -----</p> <p>(2) -----</p> <p>(3) -----</p> <p>(4) -----</p> <p><b>お問合せ先</b></p> <p>株式会社ダナフォーム</p> <p>お客様相談室 TEL: ー</p> <p>受付: 月～金(祝日除)ー</p>
---	--

72

[図10]



Fwd T7 loxP Sfi I Sal I \*\*\*\*\* Bam HI Sfi I T3 Rev  
TGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGC  
TCCAACCGCGGTGCCCGCCGCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATG  
GATCAGGCCAAATCGGCCGAGCTCGAATTCGTCGAC\*\*\*\*\*  
 \*\*\*\*\*  
GGATCCGGCCATAAGGGCC TGATCCTTCGAGGGGGGGCCCGGTACCAGCTTTTGT  
TGCTTTAGTGAGGGTTAATTTCGAGCTTGGCGTAATCATGTCATAGCTGTTTC  
CTGTGTGAATTGTT

[図11]

**cDNA: malate dehydrogenase**  
**Clone ID: 1500012M15**

**DNA sequence**

A 10x10 grid of dots for handwriting practice. The grid consists of 10 rows and 10 columns of small black dots, providing a guide for letter size and placement.

### Amino acid sequence


[illegible]

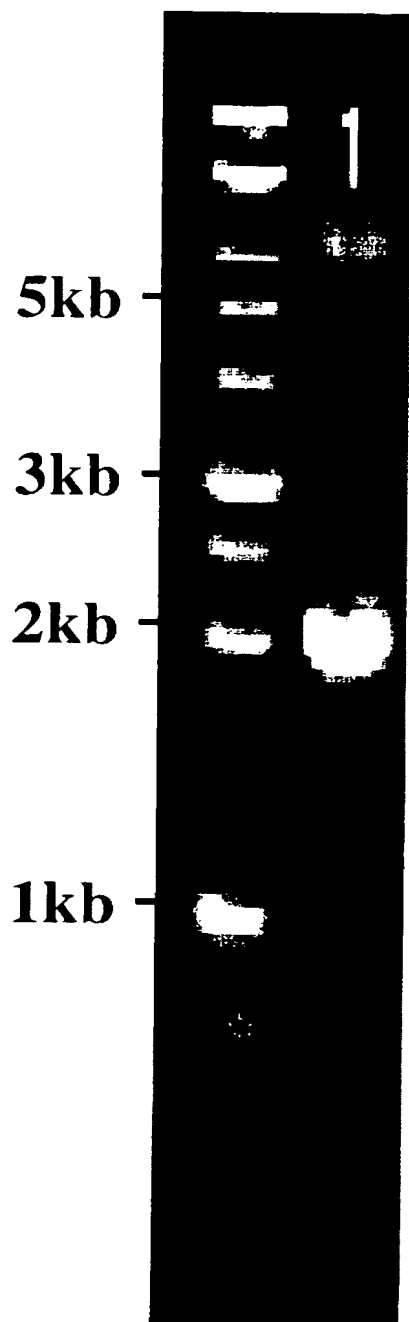
## Primer

—21M13 : 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

1233-Rv : 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

malate dehydrogenase cDNA  
primers

[12]



# Amplification for ヒト黄体ホルモン

**DNA sequence**

[illegible]

# Primer

—21M13 : 5'-TGTAACGACGGCAGT-3'  
1233-Rv : 5'-AGCGGATAACAAATTCACACAGGA-3'

Amplification mixture for  
ヒト黄体ホルモン



[図14]

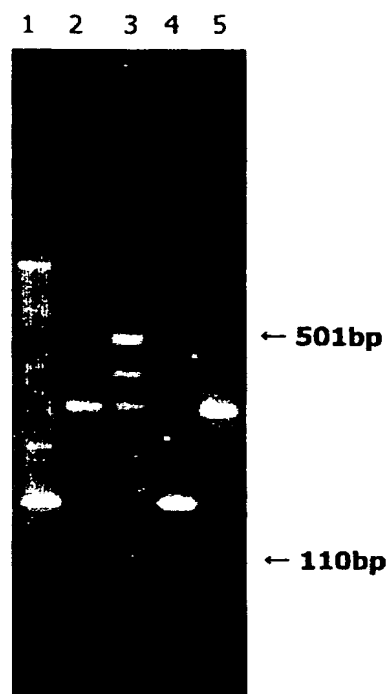
Lane 1: primer set 1, aptamer (-)

Lane 2: primer set 2, aptamer (-)

Lane 3: size marker

Lane 4: primer set 1, aptamer(+)

Lane 5: primer set 2, aptamer(+)





[15]

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase  
Clone ID: 1500012M15

DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)  
Clone ID: 1500012E04





DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)  
Clone ID: E030024J03

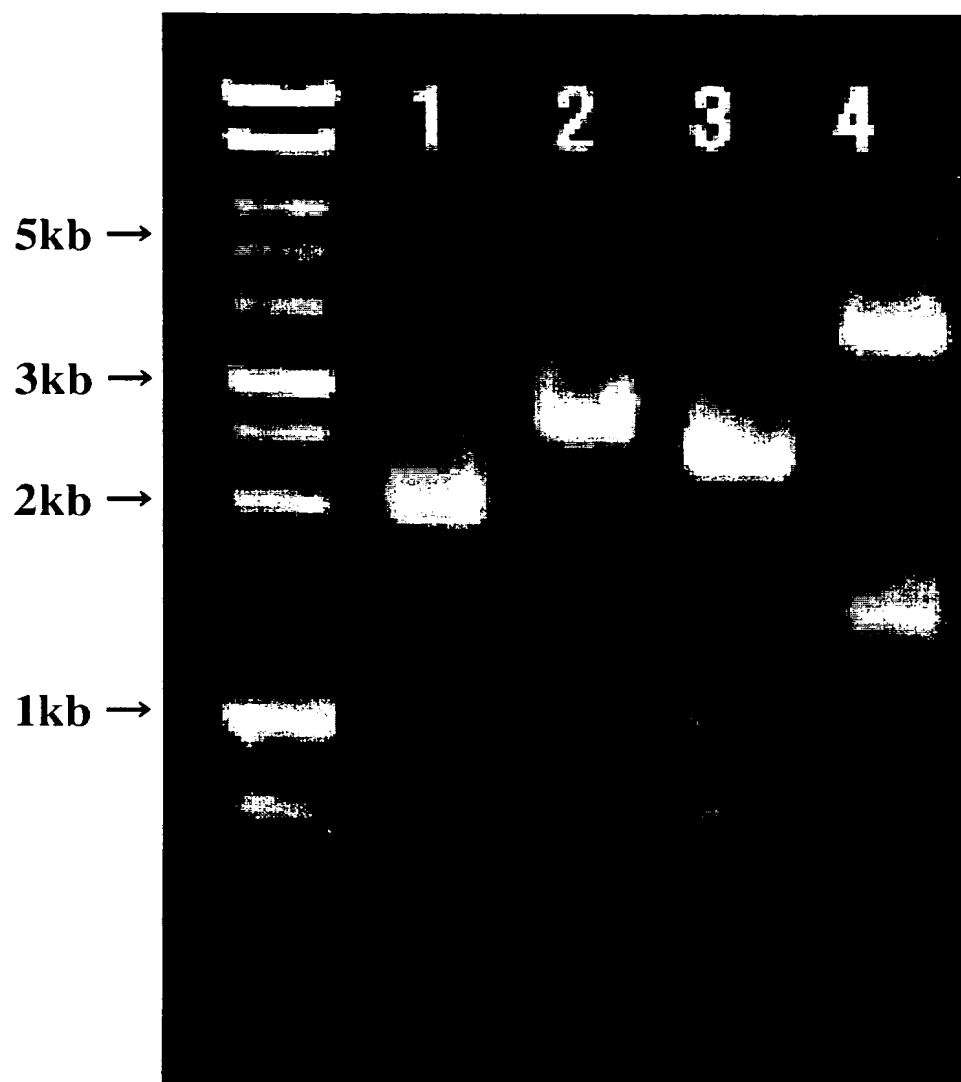
DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)  
Clone ID: E430020N12

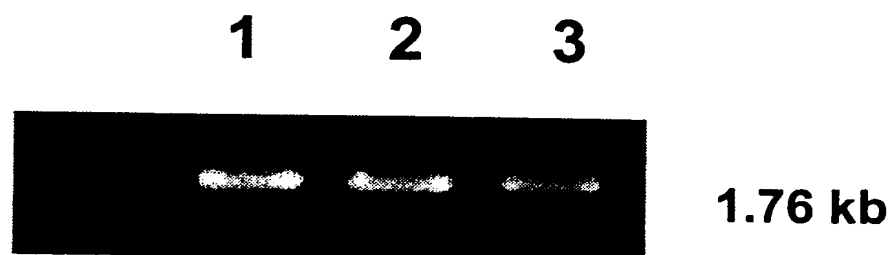
DNA sequence  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 1	
Clone 2	
Clone 3	
Clone 4	

[図16]



[図17]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014245

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/10, 9/12, 11/02, C12M1/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/10, 9/12, 11/02, C12M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI(DIALOG), Web of Science, PubMed JSTPlus(JICST)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 10-503383 A (Gen-Probe Inc.), 31 March, 1998 (31.03.98), Particularly, Claims 13 to 31 & EP 726310 A1 & WO 96/24664 A1 & US 5556771 A & US 5614387 A & US 5834254 A	1-2, 6-13 3-5
X Y	JP 2000-514298 A (INVITEK GMBH.), 31 October, 2000 (31.10.00), Particularly, Claims 1 to 6; example 2 & WO 97/48109 A1 & US 5705085 A & EP 904591 A1	1-2, 6-13 3-5
Y	WAN CY. et al., Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. PCR Methods. Appl., 1993, 3(3), pages 208 to 210	3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 November, 2004 (16.11.04)

Date of mailing of the international search report  
30 November, 2004 (30.11.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014245

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LIN Y. et al., Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. J.Mol.Biol., 1997, 271(1), pages 100 to 111	4-5
A	KAWAI, J. et al., DNA book. Genome Res., 2003 June, 13(6B), pages 1488 to 1495	1-13
A	JP 2003-519482 A (Watman Inc.), 24 June, 2003 (24.06.03), Full text & WO 01/51601 A2                      & US 2002/0006615 A & EP 1254271 A2	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/10, 9/12, 11/02, C12M1/00, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/10, 9/12, 11/02, C12M1/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS/WPI(DIALOG), Web of Science, PubMed JSTPlus(JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 10-503383 A(ジェン-プローブ・インコーポレーテッド), 1998.03.31, 特に, 請求項13-31参照 & EP 726310 A1 & WO 96/24664 A1 & US 5556771 A & US 5614387 A & US 5834254 A	1-2, 6-13 /3-5
X/Y	JP 2000-514298 A(インヴィテック ゲーエムベーハー)2000.10.31 特に, 請求項1-6, 実施例2参照 & WO 97/48109 A1 & US 5705085 A & EP 904591 A1	1-2, 6-13 /3-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
16. 11. 2004

国際調査報告の発送日  
30.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
上條 肇

4 B 3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WAN CY. et al., Spermidine facilitates PCR amplification of target DNA. PCR Methods. Appl., 1993, 3(3), p. 208-10	3
Y	LIN Y. et al., Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. J. Mol. Biol., 1997, 271(1), p. 100-11	4-5
A	KAWAI J. et al., DNA book. Genome Res., 2003 Jun, 13(6B), p. 1488-95	1-13
A	JP 2003-519482 A(ワットマン インコーポレイテッド) 2003. 06. 24, 全文 & WO 01/51601 A2 & US 2002/0006615 A & EP 1254271 A2	1-13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**